

中国裸胸鳝属 10 种鱼类分子系统发育关系的 16S rDNA 分析

杜 民¹, 尹绍武², 刘艳红¹, 牛宝珍¹, 齐兴柱³, 张 本³, 廖经球³, 霍 蕊³

(1. 红河学院 云南省高校农作物优质高效栽培与安全控制重点实验室, 云南 蒙自 661199; 2. 南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210023; 3. 海南大学 海洋学院 热带生物资源教育部重点实验室, 海南 海口 570228)

摘要: 为了阐明南中国海裸胸鳝属(*Gymnothorax*)鱼类系统进化情况, 利用聚合酶链式反应扩增目的产物, 将其连接到 T 载体后, 并对其序列进行测定, 共得到 9 种裸胸鳝属鱼类线粒体 16S ribosomal DNA(16S rDNA)基因的部分序列, 采用多个生物软件对序列变异和碱基组成进行分析, 计算了 Kimura2-parameter 遗传距离, 转换/颠换比等遗传信息指数, 下载基因库中 16S rDNA 基因的同源序列, 以鳗鲡属(*Anguilla*)的花鳗鲡(*Anguilla marmorata*)为外群构建 NJ(Neighbor-Joining)、MP(Maximum Parsimony)和 ME(Minimum Evolution)系统进化树。根据所得分子数据并结合形态学特征推论如下: (1) 在所研究的 10 种裸胸鳝鱼中共有 516 个位点, 其中 143 个核苷酸位点存在变异(27.7%); (2) 序列变异的转换/颠换比值的平均值为 3.441; 相对遗传距离数据表明斑颈裸胸鳝(*G. margaritophorus*)和网纹裸胸鳝(*G. reticularis*)差异最大(0.177), 褐裸胸鳝(*G. hepaticus*)与布雷顿氏裸胸鳝(*G. breedeni*)差异最小(0.022); (3) NJ 树、ME 树表明裸胸鳝属内部存在 3 个平行进化的姐妹分支, 分支内部种类组成与地理分布无关。

关键词: 裸胸鳝属(*Gymnothorax*); 16S rDNA 基因; 序列比较; 遗传距离

中图分类号: Q959 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2013)06-0016-08

裸胸鳝属于硬骨鱼纲(Osteichthyes), 鳗鲡总目(Anguillomorpha) 鳗鲡目(Anguilliformes) 海鳝科(Muraenidae)^[1], 中国裸胸鳝属(*Gymnothorax*)共有 20 个物种^[2]。裸胸鳝为暖水性鱼类, 在中国广泛分布于西沙群岛、海南岛、台湾以及广东、福建沿海等海域。裸胸鳝的传统分类主要依据体表的颜色、斑点、条纹等。但裸胸鳝鱼类在不同的成长阶段, 不同的生活环境及不同的应激状态下, 其外部斑纹都会有一定的变化, 此外可能存在种间杂交等因素也对裸胸鳝鱼的系统分类造成很大困难。

通过现代分子生物学技术, 获得物种特定遗传标记的大量数据, 构建系统进化树是对传统分类的重要佐证以及补充或修正。线粒体 DNA 结构简单, 严格母系遗传, 是研究物种起源进化及分析种间亲缘关系的理想标记, 其中 16S rDNA 基因进化速度较为适中, 常用于种以上水平的系统进化研究, 是探讨种间和种内生物进化和系统发育最常用的分子标记之一, 它的一个基因片段包含了从种内到种间乃至科间的进化遗传信息^[3-4], 在系统进化和分类研究上有较强的适用性^[5-6], 该基因已被广泛应用到鱼类属和种间的系统发育关系中, 解决了一些分类和系

统演化关系的问题^[1, 7-8], 齐兴柱等^[9]利用细胞色素氧化酶亚基 (mtDNA-CO₁) 基因片段序列对 6 种裸胸鳝属鱼类进行了分析, 又利用细胞色素氧化酶亚基 (mtDNA-CO₂) 的基因片段序列对另外 6 种裸胸鳝属的分类情况进行了聚类研究^[10], 杜民等^[11]利用细胞色素 b 基因的片段序列对 6 种裸胸鳝的分类情况进行了分析。

本研究以分布于中国南海裸胸鳝属常见的细斑裸胸鳝(*G. fimbriatus*)、黄纹裸胸鳝(*G. pseudothyrsoides*)、网纹裸胸鳝(*G. reticularis*)、宽带裸胸鳝(*G. rueppeliae*)、斑第氏裸胸鳝(*G. berndti*)、斑颈裸胸鳝(*G. margaritophorus*)、布雷顿氏裸胸鳝(*G. breedeni*)、黑点裸胸鳝(*G. melanospilus*)、褐裸胸鳝(*G. hepaticus*)等 9 种鱼类^[12-13]为对象, 采用聚合酶链式反应将

收稿日期: 2012-11-12; 修回日期: 2013-03-22

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划重点项目(2007BAD29B03)

作者简介: 杜民(1974-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 水生生物技术与育种, E-mail: du2005min@126.com; 尹绍武, 通信作者, 博士, 研究员, 研究方向: 鱼类种质资源与遗传育种, E-mail: yin-shaowu@163.com; 刘艳红, 通信作者, 博士, 教授, 研究方向: 水域资源与环境管理政策, E-mail: kidliu1968@126.com

PCR 扩增产物克隆到 T 载体后进行 16S rDNA 基因序列测定, 结合 GenBank 中蠕纹裸胸鲢(*G. kidako*)的 16S rDNA 基因序列, 并用从 GenBank 中下载的花鳗鲡(*Anguilla marmorata*)的 16S rDNA 基因序列作为外群进行比较分析和构建分子系统树, 初步探讨裸胸鲢属鱼类的系统发育关系, 为进一步完善裸胸鲢属鱼类分类系统演化关系提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 样品来源

样品从中国海南附近海域及西沙群岛采集(表 1), 共有 9 个种类, 每种采集 3~6 尾, 实验的裸胸鲢属鱼类根据成庆泰等^[1]编著的《中国鱼类系统检索》和沈世杰^[12]编著的《台湾鱼类检索》上报道的标准进行种类鉴定。除了蠕纹裸胸鲢、外群花鳗鲡(*Anguilla marmorata*)以外, 其他的裸胸鲢均来自中国南海海域, 其来源见表 1。

表 1 研究动物和 DNA 序列数据来源

Tab. 1 Sources of DNA sequence data and tissue samples of studied animals

种类	采集地	Genbank 序列号
宽带裸胸鲢 (<i>Gymnothorax rueppelliae</i>)	中国 南海	JX914621
黑点裸胸鲢 (<i>G. melanospilus</i>)	中国 南海	JX914618
黄纹裸胸鲢 (<i>G. pseudothyrsoides</i>)	中国 南海	JX914619
网纹裸胸鲢 (<i>G. reticularis</i>)	中国 南海	JX914620
细斑裸胸鲢 (<i>G. fimbriatus</i>)	中国 南海	JX914615
斑颈裸胸鲢 (<i>G. margaritophorus</i>)	中国 南海	JX914617
褐裸胸鲢 (<i>G. hepaticus</i>)	中国 南海	JX914616
斑第氏裸胸鲢 (<i>G. berndti</i>)	中国 南海	JX914613
布雷顿氏裸胸鲢 (<i>G. breedeni</i>)	中国 南海	JX914614
蠕纹裸胸鲢 (<i>G. kidako</i>)	中国 东海	NC004417
花鳗鲡(<i>Anguilla marmorata</i>)		AB021760

1.2 总 DNA 的提取

样品取背部肌肉于 95%乙醇中保存(-20℃冻存)。基因组 DNA 的提取参考 Sambrook 等^[13]的酚/氯仿抽提法。取 5μL 产物用 1.0%琼脂糖凝胶, 5V/cm, 进行电泳检测。然后存放于-20℃用作 PCR 反应的模板。

1.3 PCR 扩增与序列测定

扩增采用嵌合式 PCR 方法, 第 1 次 PCR 的产物作为第 2 次 PCR 的模板。目的片段扩增用的引物是挑选一种海鲢科鱼类线粒体基因组序列作为模板, 利用 Primer5.0 软件在其 16S rDNA 基因序列两端的保守区设计 2 对引物 Gym16SrRNA_{sen2}、Gym16SrRNA_{ant2}、Gym16SrRNA_{sen3} 和 Gym16SrRNA_{ant3}, 由上海生物技术有限公司合成, 引物序列 Gym16SrRNA_{sen2} 为 5'-CGTGCAAATCGAGTCGTCC-3', Gym16SrRNA_{ant2} 为 5'-TCTGCCACC TTAGC ATGCC-3', Gym16SrRNA_{sen3} 为 5'-AGCCTGAACACAACCGTAACC-3', Gym16SrRNA_{ant3} 为 5'-CAGGTG GCTGCTTTTAGGC-3'。反应总体积 25 μL, 其中 Buffer 和 dNTP 各 2.5μL, 去离子水 16.2μL, 正向和反向引物各 1.3 μL, mtDNA 模板 1.0 μL, ExTaq 酶 0.2 μL。扩增条件为 94℃预变性 4 min, 然后循环 40 次(94℃变性 0.5 min, 50℃退火 0.5 min, 72℃延伸 2 min), 最后 72℃延伸 10 min。PCR 反应试剂盒(包括 Buffer、dNTP 和 ExTaq 酶)购自大连宝生物公司。利用未加模板 DNA 的反应液作为空白对照以检查是否有污染存在。PCR 产物用 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测, 于-20℃保存。

1.4 PCR 产物纯化和测序

扩增得到的 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳, 所需带切下后利用宝生物工程(大连)有限公司生产的 DNA 凝胶回收试剂盒(TaKaRa Anarose Gel DNA Purification Kit Ver. 2. 0)纯化回收。并将其构建到 PMD18-T 载体并送上海生工测序, 测序引物为通用引物 M13^[14]。

1.5 DNA 序列数据的处理

利用在线的 blast 软件及 Clustal X^[15]排定 DNA 序列并经人工核查。采用 DNASP4.0 软件分析 10 种裸胸鲢的多态位点和多态简约信息位点数; 用分子进化遗传分析软件 MEGA5.0^[16]软件计算不同序列间的碱基替代数、变异位点、颠换百分比、转换/颠换比率; 系统分析采用邻接法 Neighbore-Joining(简称 NJ)里面的 Kimura 2-parameter 法, 最小进化法

<i>G. melanospilus</i>	...CA G... ..T. C. C... ..
<i>G. hepaticus</i>	...AA .G... ..T... ..GCT... ..
<i>G. berndti</i>	...AC .G... ..C... ..G.T... ..
<i>G. fimbriatus</i>	CCA AGC AAA GAG AAC TTA AGT TTG ACC CCC CGA AAC CAG GGG AGC TAC TCC GAA GCA GCC
<i>G. pseudothyrsoides</i>	...
<i>G. kidako</i>	...G... ..A... ..T... ..G... ..
<i>G. rueppelliae</i>	...A... ..G... ..
<i>G. reticularis</i>	...G... ..G... ..T... ..G... ..
<i>G. margaritophorus</i>	...G... ..G... ..T... ..G... ..
<i>G. breedeni</i>	...T... ..G... ..
<i>G. melanospilus</i>	...G... ..G... ..T... ..T... ..G... ..
<i>G. hepaticus</i>	...A... ..T... ..G... ..
<i>G. berndti</i>	...G... ..AA... ..T... ..G... ..
<i>G. fimbriatus</i>	CAA AGG GGC AAA CCC GTC TCT GTG GCA AAA GAG TGG AGA GAC TTC CGA GTA GAG GTG ATA
<i>G. pseudothyrsoides</i>	...
<i>G. kidako</i>	...T... ..G... ..C... ..A... ..C... ..
<i>G. rueppelliae</i>	...T... ..A... ..G... ..C... ..A... ..C... ..
<i>G. reticularis</i>	...G... ..GA... ..T... ..
<i>G. margaritophorus</i>	T... .A... ..G... ..C... ..A... ..CG... ..
<i>G. breedeni</i>	T... .A... ..A... ..A... ..C... ..A... ..C... ..
<i>G. melanospilus</i>	...G... ..C... ..C... ..C... ..
<i>G. hepaticus</i>	...T... ..C... ..C... ..C... ..
<i>G. berndti</i>	...T... ..C... ..A... ..C... ..
<i>G. fimbriatus</i>	AGC CTA CCG AAC CTG GTG ATA GCT GGT TGC TCA GAA ACT GAA TAT AAG TTC AGC GCT ATA
<i>G. pseudothyrsoides</i>	...
<i>G. kidako</i>	...A... ..C... ..G... ..G... ..C... ..G... ..
<i>G. rueppelliae</i>	...A... ..C... ..G... ..G... ..C... ..G... ..
<i>G. reticularis</i>	...A... ..A... ..G... ..G... ..G... ..G... ..T... ..G... ..
<i>G. margaritophorus</i>	...CTG .G... ..A... ..C... ..AT... ..
<i>G. breedeni</i>	...G... ..A... ..A... ..
<i>G. melanospilus</i>	...C... ..G... ..A... ..G... ..T... ..
<i>G. hepaticus</i>	...G... ..C... ..A... ..A... ..
<i>G. berndti</i>	...G... ..C... ..A... ..A... ..
<i>G. fimbriatus</i>	-AT ATT CTA AC- CTT ATT CAC AAA AAG AAC AAG CAA GAT ATA GCA GTT AAT CAA AAG GGG
<i>G. pseudothyrsoides</i>	...G... ..
<i>G. kidako</i>	...A C... ..C... ..A T.A... ..G... ..G... ..C... ..C... ..G... ..
<i>G. rueppelliae</i>	...A C... ..C... ..A T.A... ..G... ..G... ..T... ..C... ..G... ..
<i>G. reticularis</i>	-CC... ..TT- T... ..GA TCT G... ..G... ..G... ..G... ..T... ..G... ..
<i>G. margaritophorus</i>	...A T.C... ..G... ..C... ..GCA .T... ..GA .G... ..T... ..A.C... ..AT... ..G... ..T... ..A... ..
<i>G. breedeni</i>	-CA .C... ..G... ..GCA TGA... ..GA .-... ..G TG... ..AT... ..G... ..A... ..
<i>G. melanospilus</i>	...A... ..G... ..A... ..G.A A.T G... ..A .-G... ..T... ..A... ..G... ..C... ..
<i>G. hepaticus</i>	T.A... ..C... ..G.G.T... ..A.A... ..GT... ..C... ..G... ..
<i>G. berndti</i>	T.A... ..C... ..G... ..T... ..A.T... ..GT... ..A... ..C... ..G... ..
<i>G. fimbriatus</i>	TAC AGC CCT TTT GAT AAA GGA TAC AAC CTT ACT -AA GGA GGA AAA GGA CAA TTA TCG CAA
<i>G. pseudothyrsoides</i>	...G... ..
<i>G. kidako</i>	...GA... ..C... ..T... ..T.G... ..G... ..TC... ..A-... ..A.C... ..
<i>G. rueppelliae</i>	...A... ..T... ..T.G... ..G... ..T... ..A-... ..A.C... ..
<i>G. reticularis</i>	...A... ..G... ..G... ..G... ..TC... ..A... ..ATT... ..T... ..
<i>G. margaritophorus</i>	...T... ..A... ..A... ..T... ..-T... ..C... ..G... ..TC... ..AA... ..ATC... ..
<i>G. breedeni</i>	...T... ..A... ..G... ..C... ..AG... ..A.C... ..
<i>G. melanospilus</i>	...T... ..A... ..T... ..-... ..C... ..TT... ..AA... ..A.T... ..T... ..
<i>G. hepaticus</i>	...A... ..C... ..C... ..C... ..TC... ..AA... ..A.C... ..
<i>G. berndti</i>	...A... ..C... ..C... ..C... ..TC... ..AA... ..A.C... ..
<i>G. fimbriatus</i>	GGT ACT TCC CCC AGT GGG CCT AAA AGC AGC CAC CTG
<i>G. pseudothyrsoides</i>	...
<i>G. kidako</i>	...C .TC .T... ..
<i>G. rueppelliae</i>	...C .TC .T... ..
<i>G. reticularis</i>	...C... ..
<i>G. margaritophorus</i>	...C... ..
<i>G. breedeni</i>	...C... ..C... ..T... ..
<i>G. melanospilus</i>	...C... ..C... ..
<i>G. hepaticus</i>	...C... ..C... ..T... ..
<i>G. berndti</i>	...C... ..C... ..T... ..

图 1 裸胸鳝属鱼类 16S rDNA 516bp 的碱基序列

Fig.1 DNA sequences of mitochondrial 16S ribosomal DNA 516 bp of ten species of *Gymnothorax*.

...表示此位点与上排细斑裸胸鳝的核苷酸相同

... denote the nucleotide of this position is identical with the nucleotide of *G. kidako* in the upper row accordingly

从图 1 可知, 对本实验所研究的 10 个裸胸鳝鱼类的线粒体 16S rDNA 基因扩增片段序列经排序, 共获得 516 bp 的碱基序列, 部分位点存在缺失现象。

2.3 10 种裸胸鳝之间的相对遗传距离

利用 MEGA5.0 软件中的双参数法, 以转换加颠换、转换比颠换分别计算 10 种裸胸鳝之间的相对遗传距离(表 3)。

从表 3 可知, 10 种裸胸鳝之间的序列差异(转换加颠换)为 0.022~0.177, 其中褐裸胸鳝和布雷顿氏裸胸鳝序列差异最小为 0.022, 网纹裸胸鳝与斑颈裸胸鳝的序列差异最大为 0.177, 平均为 0.123; 种间序列差异不大。此外, 10 种裸胸鳝鱼类之间序列碱基转换与颠换比值为 1.732~5.830, 平均为 3.441。一般认为转换颠换比值小于 2.0 时基因序列突变已经达到饱

表 3 相对遗传距离

Tab. 3 Pairwise distance matrix

物种名称	细斑裸胸鳝 <i>G.fimbriatus</i>	黄纹裸胸鳝 <i>G.pseudothyrosoideus</i>	蠕纹裸胸鳝 <i>G.kidako</i>	宽带裸胸鳝 <i>G.rueppeliae</i>	网纹裸胸鳝 <i>G.reticularis</i>	斑颈裸胸鳝 <i>G.margaritophorus</i>	斑第氏裸胸鳝 <i>G.berndti</i>	黑点裸胸鳝 <i>G.melanospilus</i>	褐裸胸鳝 <i>G.hepaticus</i>	布雷顿氏裸胸鳝 <i>G.breedeni</i>
<i>G.fimbriatus</i>			3.175	1.937	1.788	3.452	3.060	2.194	3.306	3.109
<i>G.pseudothyrosoideus</i>			3.252	1.996	1.732	3.452	3.060	2.306	3.192	3.005
<i>G.kidako</i>	0.136	0.139		5.481	3.909	4.904	4.583	2.959	4.356	3.852
<i>G.rueppeliae</i>	0.121	0.123	0.052		4.187	4.623	4.004	2.600	3.432	2.896
<i>G.reticularis</i>	0.121	0.118	0.129	0.094		3.544	3.098	2.259	3.224	2.946
<i>G.margaritophorus</i>	0.164	0.164	0.168	0.160	0.177		4.709	3.330	5.830	4.845
<i>G.berndti</i>	0.141	0.141	0.147	0.132	0.134	0.103		2.737	5.241	4.476
<i>G.melanospilus</i>	0.145	0.150	0.146	0.148	0.155	0.141	0.146		3.806	2.844
<i>G.hepaticus</i>	0.087	0.085	0.108	0.108	0.129	0.138	0.113	0.137		2.708
<i>G.breedeni</i>	0.091	0.089	0.108	0.103	0.129	0.130	0.110	0.134	0.022	

注: 对角线以下是转换加颠换, 对角线以上是转换比颠换

和状态^[17-18], 这说明 10 种裸胸鳝大部分种类的 16S rDNA 基因片段序列变异并不显著。

2.4 10 种裸胸鳝鱼类系统进化树的建立

以花鳃鲷作为外群构建 NJ 树(图 2A)、MP 树(图 2B)和 ME 树(图 2C)所有系统树枝上数值为 1000 次自举(Bootstrap)检测得到的对该分支的支持百分数。从图 2 中可以看出这 3 种不同的分子系统进化树具有基本相同的拓扑结构。分为明显的两大分支, 花鳃鲷分为独立的一支, 本实验的 10 种裸胸鳝鱼类分为另外一支。

3 讨论

1795 年, Bloch 将裸胸鳝属定义为 *Gymnothorax*。目前, 对裸胸鳝属鱼类的分类仅依据体色花纹等外形特征^[1, 12], 而且在不同的生长阶段体色花纹不尽相同, 属、种间也出现重叠, 依据形态的分类方式十分困难, 而且也容易出错。裸胸鳝属鱼类与鳃鲷属的

花鳃鲷同属于鳃鲷科。本实验研究结果也支持这一观点: 利用 ClustalX 软件计算 10 种裸胸鳝的 16S rDNA 部分序列之间的序列相似性(在本文的 10 个裸胸鳝属鱼类中, 云纹裸胸鳝和斑点裸胸鳝序列相似性最小值为 81%, 本研究中其余的裸胸鳝鱼类之间相似性都高于 81%)高于它们与花鳃鲷的 16S rDNA 部分序列相似性(本研究的 10 个裸胸鳝属鱼类与花鳃鲷相似性比较中, 斑点裸胸鳝和花鳃鲷的序列相似性属间最大为 80%, 其余裸胸鳝属鱼类与花鳃鲷相似性都低于 80%)。NJ 树和 MP 树的聚类图表明: 花鳃鲷与裸胸鳝属其中鱼类分离, 成为单独一支, 与传统分类结果一致, 证明 16S rDNA 是解决分类及系统进化问题最可信的分子标记之一^[19]。

采用 DNASP4.0 软件分析 10 种裸胸鳝的多态简约信息位点(Parsimony informative sites)和单突变位点(Singleton variable sites), 发现在所测的 516 个碱基序列中, 存在插入缺失现象, 共检测出 10 个缺失位点, 143 个核苷酸变异位点。占整段序列的 27.7%。

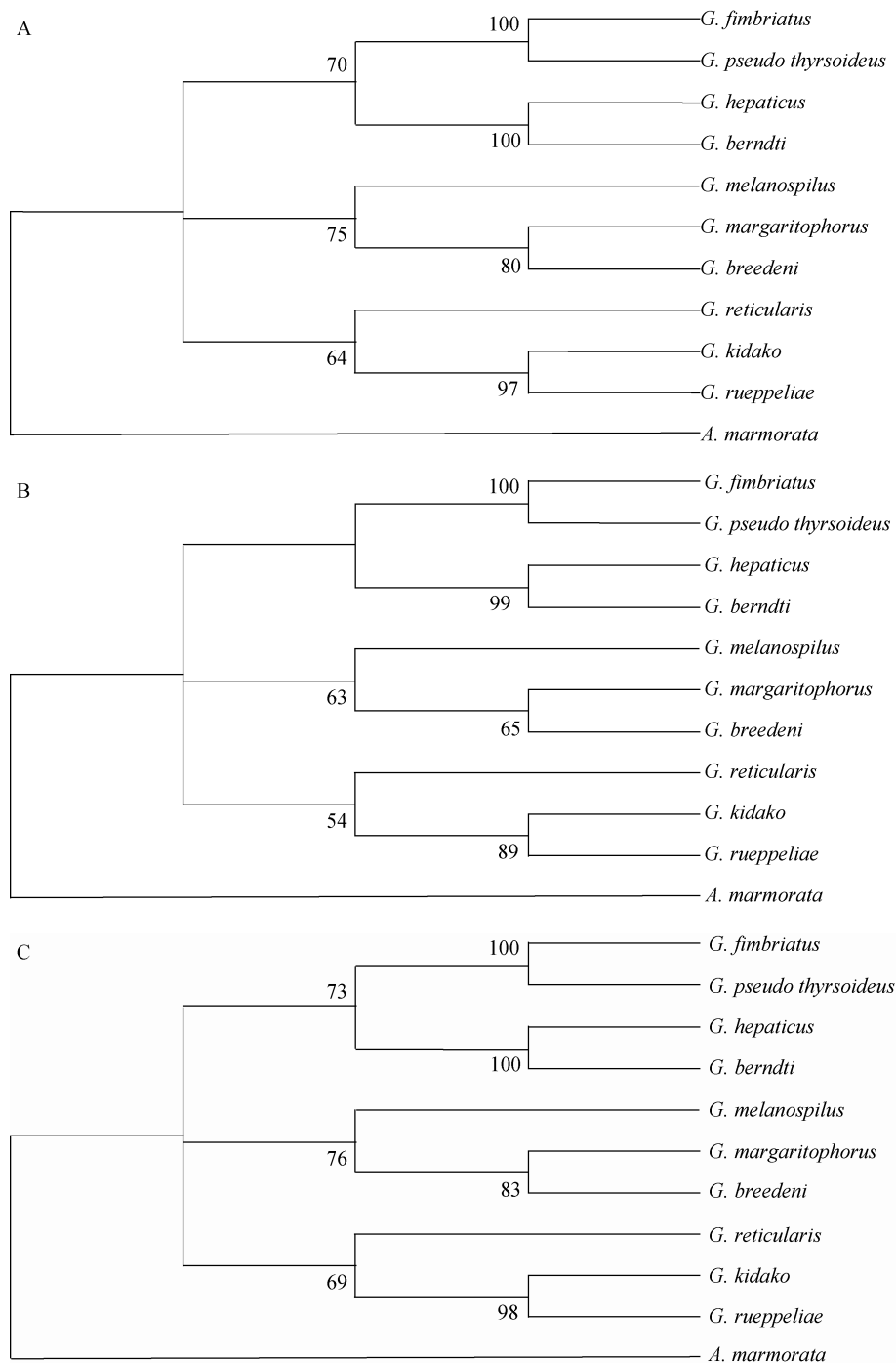


图 2 基于 16S rDNA 基因部分序列构建的分子系统树

Fig. 2 Molecular phylogenetic trees based on 16S ribosomal DNA sequences data with bootstrap test

图中数字为自举置信水平(BCL)值

The values of Bootstrap confidence level (BCL)of the nodes are indicated above the branch

简约信息位点 (two variants)为 80 个, 简约信息位点 (three variants)为 21 个; 多态简约信息位点数(Parsimony informative sites)共计为 101 个, 单突变位点数(Singleton variable sites)为 42 个, 单突变位点 (two variants)为 35

个, 单突变位点(three variants)为 7 个。总体上看, 序列中的转换明显比颠换多, 平均为 3.441(表 3), 说明序列突变已经达到饱和。其中 A-C 和 A-T 颠换多于 C-G 和 T-G 颠换, T-C 转换多于 A-G 转换。T、C、A、G 的含

量平均值分别为 18.0%、22.1%、37.8%、22.1%，其中 A+T 含量(55.8%)明显高于 C+G 含量(44.2%)，序列表现出较明显的 A 偏倚，而 G 偏倚并不明显^[20]。

NJ 树、MP 树和 ME 树的聚类图表明：拓扑结构分为明显的两个大分支，其中花鳗鲡单独聚为一支，说明在所分析的 11 种鱼中，它是最早分化出来的。本研究的 10 种裸胸鲯中的其他种类，NJ 树和 ME 树的聚类图表明又分为 3 个平行进化的小分支，即蠕纹裸胸鲯、波纹裸胸鲯和宽带裸胸鲯先聚为一支(置信度分别为 64%、69%)，布雷氏裸胸鲯、斑颈裸胸鲯和黑点裸胸鲯聚为一支(置信度 75%、76%)，细斑裸胸鲯、黄纹裸胸鲯、褐裸胸鲯和斑第氏裸胸鲯聚为一支(置信度 70%、73%)；而 MP 树的结果表明分为四个平行进化的小分支，即蠕纹裸胸鲯、波纹裸胸鲯和宽带裸胸鲯先聚为一支(置信度 54%)，布雷氏裸胸鲯、斑颈裸胸鲯和黑点裸胸鲯聚为一支(置信度 63%)，细斑裸胸鲯和黄纹裸胸鲯聚为一支(置信度 100%)，褐裸胸鲯和斑第氏裸胸鲯聚为一支(置信度 99%)。说明在本研究的 10 种裸胸鲯属鱼中，可能存在着几种平行进化的种类。GenBank 上面蠕纹裸胸鲯的样本来源于日本海，而其余的 9 种裸胸鲯来源于中国南海，从系统树上来看，它们之间并没有明显的地区差异；这个研究结果与其他的 research 结果相一致：杜民等^[11]利用 6 种裸胸鲯的细胞色素 b 基因的全长序列构建的系统树显示来自日本海的蠕纹裸胸鲯与来自中国南海的另外 5 种裸胸鲯没有地域上的差别，齐兴柱等^[9]利用 6 种裸胸鲯的细胞色素氧化酶亚基 (mtDNA-CO I)构建的系统进化树及利用 6 种裸胸鲯的细胞色素氧化酶亚基 mtDNA-CO II^[10]的聚类结果也展示了被研究的裸胸鲯的基因序列并没有地域上的差异。

本研究通过用实验者自行设计的引物对其 16S rDNA 进行 PCR 扩增并对扩增的序列进行比较研究的结果表明，设计的这对引物在裸胸鲯鱼类中具有普遍的适应性，所扩增的序列除了宽带裸胸鲯与黄纹裸胸鲯、网纹裸胸鲯与黄纹裸胸鲯转换比颠换值小于 2 外(如果某个物种的基因序列比较时，转换与颠换的比值小于 2 时，则此基因序列的突变已经达到饱和状态，受进化噪音的影响可能性较大，构建系统进化树时可能会受影响)^[21]，本研究裸胸鲯的其余种类之间的转换比颠换值都在 2 以上且序列差异也不大，说明本实验中裸胸鲯鱼类的 16S rDNA 基因片段序列突变还没有达到饱和，构建的系统进化树具有的可信度较高。本研所得的 16S rDNA 序列适合裸胸鲯鱼类的分子进化和遗传多样性分析。本

研究通过对 10 种裸胸鲯鱼类的 16S rDNA 基因部分序列的比较研究，以期对整个裸胸鲯属鱼类分子水平的系统发生和进化研究以及遗传多样性研究提供依据。裸胸鲯属鱼类分类较为复杂，系统发生关系有待对更多的种类从分子水平来揭示。

参考文献:

- [1] 成庆泰, 郑葆珊. 中国鱼类系统检索[M]. 北京: 科学出版社, 1987: 99-108, 747-757.
- [2] 孟庆闻, 苏锦祥, 缪学祖. 鱼类分类学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1995: 18, 139-141.
- [3] Kocher T D, Thomas W K, Meger A, et al. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1989, 86: 6190-6200.
- [4] Meyer A, Wilson A C. Origin of tetrapods inferred from their mitochondrial DNA affiliation to lungfish [J]. J Mol Evol, 1990, 31: 359-364.
- [5] Irwin D M, Kocher T D, Wilson A C. Evolution of the cytochrome b gene of mammals [J]. J Mol Evol, 1991, 32: 128-144.
- [6] Wilson A C, Cann R L, Carr S M, et al. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics [J]. Biol J Linn Soc, 1985, 26: 375-400.
- [7] Martin A P, Bermingham E. Systematics and evolution of lower central American cichlid inferred from analysis of cytochrome b gene sequences [J]. Mol Phylogenet Evol, 1998, 9: 192-203.
- [8] Briolay J, Galtie rN, Brito R M, et al. Molecular phylogeny of Cyprinidae inferred from cytochrome b DNA sequences [J]. Mol Phylogenet Evol, 1998, 9: 100-108.
- [9] 齐兴柱, 骆剑, 刘志亮, 等. 基于 CO I 序列的 DNA 条形码在中国南海裸胸鲯属鱼类中的应用[J]. 热带生物学报, 2011, 1(4): 321-326.
- [10] 齐兴柱, 尹绍武, 张本, 等. 基于 mtDNA-CO II 基因序列对中国南海裸胸鲯属鱼类分子系统进化关系的研究[J]. 水产科学, 2010, 29(10): 605-609.
- [11] 杜民, 齐兴柱, 尹绍武, 等. 基于 Cyt b 基因序列研究 6 种裸胸鲯属鱼类的进化关系[J]. 中国水产科学, 2009, 16 (1): 24-30.
- [12] 沈世杰. 台湾鱼类检索[M]. 台北: 南天书局有限公司, 1984: 101-107.
- [13] Sambrook J, Fitch E, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd edn[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

- [14] Sambrook J, Fitch E, Maniatis T. Molecular Cloning; A Laboratory Manual. 2nd ed[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [15] Thompson J S, Gibson T J, Plewniak F, et al. The Clustal_X windows interface: Flexible strategies for multiple sequences alignment aided by quality analysis tools [J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(24): 4876-4882.
- [16] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. Mol Biol Evol, 2011, 28(10): 2731-2739.
- [17] 周继亮, 张亚平, 黄美华, 等. 蝮亚科蛇线粒体 Cytb 基因序列分析及其系统发育[J]. 动物学报, 2001, 47(4): 361-366.
- [18] 周发林, 江世贵, 苏天凤, 等. 6种笛鲷属鱼类 Cytb 基因片段序列的比较[J]. 热带海洋学报, 2004, 23(4): 87-92.
- [19] Zardoya R, Meyer A. Phylogenetic performance mitochondrial protein coding genes in resolving relationship among Vertebrates[J]. Mol Biol Evol, 1996, 13: 933-942.
- [20] 丁少雄, 王颖汇, 王军, 等. 基于 16S rDNA 部分序列探讨中国近海 30 种石斑鱼类的分子系统进化关系[J]. 动物学报, 2006, 52(3): 504-513.
- [21] Vidal N, Lecointre G. Weighting and congruence: a case study based on three mitochondrial genes in pitvipers [J]. Mol Phyl Evol, 1998, 9(3): 366-374.

Analysis of the molecular phylogenetic relationships of 10 *Gymnothorax* species from China Seas based on 16S rDNA fragment sequences

DU Min¹, YIN Shao-wu², LIU Yan-hong¹, NIU Bao-zhen¹, QI Xing-zhu³, ZHANG Ben³, LIAO Jing-qiu³, HUO Rui³

(1. Key Lab for Quality, Efficient cultivation and Security Control of Crops in Colleges and University of Yunnan province, Honghe University, Mengzi 661199, China; 2. College of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China; 3. College of Ocean, Hainan University, Key Laboratory of Tropical Biology Resources, Ministry of Education, Haikou 570228, China)

Received: Nov., 12, 2012

Key words: *Gymnothorax*; 16S ribosomal DNA; sequence comparison; genetic distances

Abstract: In order to evaluate the phylogenetic relationship of the *Gymnothorax* from the China Seas, the 16S ribosomal DNA of nine *Gymnothorax* species were amplified using PCR techniques through connecting the desired fragments to the T vector. 516 bp DNA fragments were obtained and the sequences were analyzed. The sequence variation, base composition and genetic information indexes, including Kimura-2 parameter genetic distance and Ts/Tv ratios, were generated using a suite of biology software. The 16S rDNA genes homologous sequences of *Gymnothorax* were downloaded from GenBank and NJ (Neighbour-Joining), MP (Maximum Parsimony) and ME (Minimum Evolution) trees were built through biological software based on these sequences and morphological characteristics of *Gymnothorax*. Conclusions were drawn as follow: (1) Of the 516 aligned base pairs of ten *Gymnothorax* fishes studied, 143 nucleotide sites were variable, comprising 27.7% of the total base pairs. (2) It was 3.441 of the average transition/transversion ratio among all pair wise comparisons. The maximum pairwise nucleotide divergence value among all taxa was 0.177 between *G. reticularis* and *G. margaritophorus*, and the minimum value was 0.022 between *G. hepatcus* and *G. breedeni*. (3) There are three parallel evolutionary sister clades existing (with high bootstrap value support) in *Gymnothorax* based on NJ trees, ME trees. The species within three clades seem to be irrelevant to their biogeographic distributions.

(本文编辑: 梁德海)